細　胞　機　能　制　御　学　部　門

Department of Molecular and Cellular Biology

分子医科学分野

Division of Cell Biology

教　授：中山　敬一
Professor：Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

分子医科学分野（旧分子発現制御学分野）では，細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを，遺伝学的・生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている．つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し，最終的にはその遺伝子を破壊したマウス（ノックアウトマウス）を人工的に作製し，その異常を調べることによって，その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである．同時に最新のプロテオミクス技術を駆使して，これらの変異マウスにおけるタンパク質の異常を網羅的に解析している．つまり遺伝学と生化学の両面から生物現象に迫るという手法を用いて，細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御因子の量的制御機構を，選択的タンパク質分解の視点から取り組んでいる．またこれらの異常がどのように発癌に関与するかという分子メカニズムの解明から，がんに対する根本的治療法の確立を目指している．

分子医科学分野は，中山敬一教授（主幹教授），松本有樹修准教授，片山雄太助教の教員を中心に，学振特別研究員（RPD）1 名，学術研究員 3 名（うち 1 名は特任助教称号付与），大学院生 12 名（全て博士課程），テクニカルスタッフ 5 名，共同研究員 1 名の体制で研究を進めている（2022 年 3 月 31 日現在）．

人事異動について，2020 年 4 月より溝尾太佑（大阪大学歯学部卒）と本村早麗（福岡大学薬学部卒）が大学院博士課程へ入学した．また 2020 年 10 月より，松熊明恵をテクニカルスタッフとして雇用した．

次いで退職者として，2020 年 9 月末に学術研究員の木藤有紀が米国留学のため転出した．また 2021 年 3 月末に大学院博士課程の見世慎太朗（東京大学定量生命科学研究所へ転出）と坂口千尋（九州大学医学部へ転出）が卒業した．

Ａ．腸管再生やがん化に重要な新たな幹細胞の発見

哺乳類の腸管上皮には Lgr5 発現細胞という幹細胞が存在しており，定常状態における組織の維持を担っている．一方で，Lgr5 発現細胞は化学物質や放射線などの組織傷害によって一時的にほぼ完全に失われてしまうが，腸管上皮は問題なく維持される．この事実は，Lgr5 発現細胞以外に腸管の傷害後再生に重要な幹細胞集団が存在することを強く示唆しているが，そのような幹細胞の実体や再生のメカニズムは不明だった．われわれは以前，細胞周期の静止状態を維持する p57 遺伝子が造血幹細胞や神経幹細

胞といった代表的な組織幹細胞に特異的に発現することを発見しており，この p57 の発現を指標とすることで，腸管においても新たな幹細胞集団を同定できるのではないかと考えた．

われわれの予想通り，造血幹細胞や神経幹細胞の細胞周期停止に重要な p57 遺伝子が，腸管上皮においても稀少な細胞集団に特異的に発現していることを発見した．そこで p57 の系統追跡マウスを作製し，p57 発現細胞の挙動を解析した結果，p57 発現細胞は通常の状態では分化細胞の一種として存在しているが，組織がダメージを受けると脱分化して幹細胞となり，腸管の再生に重要な役割を果たすことがわかった．さらに腸管上皮を 1 細胞 RNA-seq 法によって解析したところ，再生途上の p57 発現細胞では本来成体腸管には発現していないはずの胎児腸管の遺伝子群や胃上皮の遺伝子群が高発現していることがわかり，幹細胞性獲得の過程において通常の成体腸管とはまったく異なった細胞状態を経ていることが明らかとなった．つまり腸管の傷害後再生においては，分化した細胞の遺伝子発現プロファイルをダイナミックに作り変える（＝リプログラミングする）ことで脱分化を引き起こし，新たな幹細胞集団を作り出していると考える．われわれは，この時間的（胎児返り）・空間的（胃上皮様変化）なリプログラミングを「時空間的リプログラミング」と名付けた．p57 発現細胞はまた，Apc 変異マウスで自然発生する腸管腫瘍においてもがん幹細胞として機能しており，かつ腫瘍内でも上記と同様の時空間的リプログラミング現象が起こっていることが判明した．将来的には，このような時空間的リプログラミングのメカニズムを研究することにより，がん幹細胞を根絶する治療法を確立できると期待される．

B．精子ミトコンドリアの形態を制御する小型タンパク質の発見

古典的には，「長鎖ノンコーディング RNA」の 200 base 以上の RNA で，100 アミノ酸以上のタンパク質をコードできるオープンリーディングフレームを持たないものと定義されている．しかし実際には 100 アミノ酸以下の小型タンパク質をコードする RNA が見つかってきており，再定義の必要性が高まっているものの，どのようなメカニズムによってノンコーディングか否かが決定されていることは未だ明らかになっていない．

われわれは精巣特異的に発現することが知られている長鎖ノンコーディング RNA について，タンパク質が産生される可能性を探索した結果，Gm9999 遺伝子を候補の遺伝子として見出した．非常に興味深いことに，Gm9999 は 1 つの遺伝子座から 2 種類の小さなタンパク質を産生する可能性が示唆され，これらの双子タンパク質を「双子座（Gemini)」の星にちなんで Kastor と Polluks と名付けた．

Kastor タンパク質と Polluks タンパク質が産生されるのかを確かめるために，Kastor と Polluks タンパク質の末端にタグ配列をもつノックインマウスを作製し，発現解析からその存在を明らかにした．さらに，Kastor と Polluks の機能を推定するた

めに，ノックインマウスを用いてKastorとPolluksの結合タンパク質を免疫沈降とプロテオミクス解析によって探索した結果，KastorとPolluksは共に電位依存性アニオンチャネル（VDAC）と結合していることがわかった．

VDAC3欠損マウスは,精子ミトコンドリア鞘の形態異常により，精子の運動性が低下し，雄性不妊になることが知られていた．そこで，KastorとPolluksの両方を欠損するマウスを作製したところ，VDAC3欠損マウスと同様に，雄性不妊を示した．さらに，電子顕微鏡を用いてこれらの精子ミトコンドリア鞘を観察したところ，Kastor とPolluksの両方を欠損する精子ミトコンドリアは，明らかな形態異常を示しており（この形態異常はVDAC3を欠損した精子ミトコンドリアと非常に類似していた)，この異常により精子の運動性が低下することで，不妊につながることが判明した．以上の結果から，KastorとPolluksがVDAC3依存性のミトコンドリア鞘形成に必須な役割を果たし，それが雄の生殖機能に必要であることが示唆された．

本研究では，これまで長鎖ノンコーディングRNAと思われていたGm9999から，実はKastorとPolluksという2種類の小型タンパク質が産生され，それらが精子ミトコンドリアの形態制御を担っていることを明らかにした．KastorとPolluksは共にヒトを含む哺乳類に広く保存されており，これらの生物では，共通した機能を持つと考えられる．精巣特異的な遺伝子の機能解析は，男性不妊の原因解明だけでなく，これらを標的とした避妊薬の開発への展開が期待される．

業績目録

原著論文

1. Kawamura A., Katayama Y., Kakegawa W., Ino D., Nishiyama M., Yuzaki M., Nakayama K.I. (2021, Apr)
   The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function.
   Cell Rep. 35:108932.
2. Cherepanov S.M., Gerasimenko M., Yuhi T., Furuhara K., Tsuji C., Yokoyama S., Nakayama K.I., Nishiyama M., Higashida H. (2021, May)
   Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a Chd8 haploinsufficiency mouse model of autism.
   BMC Neurosci. 22:32.
3. Ichihara K., Matsumoto A., Nishida H., Kito Y., Shimizu H., Shichino Y., Iwasaki S., Imami K., Ishihama Y., Nakayama K.I. (2021, Jun)
   Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons.

Nucleic Acids Res. 49:7298-7317.

4. Maimaiti M., Sakamoto S., Sugiura M., Kanesaka M., Fujimoto A., Matsusaka K., Xu M., Ando K., Saito S., Wakai K., Imamura Y., Nakayama K.I., Kanai Y., Kaneda A., Ikehara Y., Ikeda J.I., Anzai N., Ichikawa T. (2021, Jun)
   The heavy chain of 4F2 antigen promote prostate cancer progression via SKP-2.
   Sci. Rep. 11:11478.
5. Matsuzaki F., Uda S., Yamauchi Y., Matsumoto M., Soga T., Maehara K., Ohkawa Y., Nakayama K.I., Kuroda S., Kubota H. (2021, Aug)
   An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver.
   Cell Rep. 36:109569.
6. Nita A., Matsumoto A., Tang R., Shiraishi C., Ichihara K., Saito D., Suyama M., Yasuda T., Tsuji G., Furue M., Katayama B., Ozawa T., Murata T., Dainichi T., Kabashima K., Hatano A., Matsumoto M., Nakayama K.I. (2021, Aug)
   A ubiquitin-like protein encoded by the "noncoding" RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing.
   PLoS Genet. 17:e1009686.
7. Sakaguchi C., Ichihara K., Nita A., Katayama Y., Nakayama K.I. (2022, Jan)
   Identification and characterization of novel proteins associated with CHD4.
   Genes Cells 27:61-71.
8. Uematsu S., Ohno S., Tanaka K.Y., Hatano A., Kokaji T., Ito Y., Kubota H., Hironaka K.I., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K.I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2022, Feb)
   Multi-omics-based label-free metabolic flux inference reveals obesity-associated dysregulatory mechanisms in liver glucose metabolism.
   iScience 25:103787.
9. Mise S., Matsumoto A., Shimada K., Hosaka T., Takahashi M., Ichihara K., Shimizu H., Shiraishi C., Saito D., Suyama M., Yasuda T., Ide T., Izumi Y., Bamba T., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Miyata H., Ikawa M., Nakayama K.I. (2022, Feb)
   Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis.
   Nat. Commun. 13:1071.
10. Higa T., Okita Y., Matsumoto A., Nakayama S., Oka T., Sugahara O., Koga D., Takeishi S., Nakatsumi H., Hosen N., Robine S., Taketo M.M., Sato T., Nakayama K.I. (2022, Mar)
    Spatiotemporal reprogramming of differentiated cells underlies regeneration and neoplasia in the intestinal epithelium.
    Nat. Commun. 13:1500.

総説

1. 片山 雄太，中山 敬一．(2021 年 6 月)
   自閉症の発症メカニズムの解明と治療法の探索.
   細胞．53:456-459.
2. 中山 敬一．(2021 年 7 月)
   新オミクス技術で見えたがん代謝の新経路【概論】がん代謝の全体像の理解に向けて.
   実験医学．39:1680-1686.
3. 小玉 学，中山 敬一．(2021 年 7 月)
   次世代プロテオミクス解析による第二のワールブルグ効果の発見.
   実験医学．39: 1694-1700.

学会発表

1. 中山 敬一．(2021, 8/28)
   がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法．（招待講演）
   第一回 日本放射線影響学会・若手部会 放射線影響研究会，オンライン.
2. 中山 敬一．(2021, 8/29)
   これからの生命科学研究：オミクスから人工知能まで．（特別講演）
   東日本研究医養成プログラム 第 11 回 「夏のリトリート」，オンライン.
3. 中山 敬一．(2021, 10/1)
   第二のワールブルグ効果 : がんにおけるグルタミン由来窒素代謝の変化．（シンポジウム）
   第 80 回日本癌学会学術総会，横浜.
4. Kokaji T., Hatano A., Ito Y., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K.-i., Egami R., Terakawa A., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Ikeda K., Arita M., Matsumoto M., Nakayama K.I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2021, 12/1)
   Comparative transomic analysis of glucose-responsive regulation of liver metabolism in obese ob/ob and wild-type mice.（シンポジウム）
   第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.
5. 松本 有樹修，市原 知哉，西田 紘士，今見 考志，石濱 泰，中山 敬一．(2021, 12/1)
   Translatome と Proteome の融合が切り開く未踏 ORF の生物学．（ワークショップ）
   第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.
6. 比嘉 綱己，沖田 康孝，松本 有樹修，中山 敬一．(2021, 12/1)
   p57 陽性細胞の追跡により明らかとなった組織再生と腫瘍における腸管上皮の時空間リプログラミング．（ワークショップ）
   第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.
7. 白石 大智，片山 雄太，西山 正章，浦 聖恵，中山 敬一．(2021, 12/1)
   クロマチンリモデリング因子 CHD8 の機能異常による自閉症発症の分子基盤の解明．（ポ

スター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

8. 見世 慎太朗，松本 有樹修，嶋田 圭祐，宮田 治彦，伊川 正人，中山 敬一．(2021, 12/1)
新規ポリペプチド Kastor/Polluks は VDAC 機能と精子のミトコンドリア形成を協調的に制御する．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

9. 白石 千瑳，松本 有樹修，松本 雅記，中山 敬一．(2021, 12/1)
がん遺伝子 c-Myc 複合体の絶対定量解析により明らかとなる新たな機能.（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

10. 和田 玲緒名，藤沼 駿，中津海 洋一，中山 敬一．(2021, 12/1)
mTORC1 下流における転写因子 PBX2 のリン酸化動態の解析．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

11. 古賀 大介，比嘉 綱己，中山 省悟，岡 毅寛，須賀原 修，中山 敬一．(2021, 12/1)
転写因子 Etv4 が腸管上皮の再生に果たす役割の解析．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

12. 岡 毅寛，比嘉 綱己，中山 敬一．(2021, 12/1)
p57 の発現により，腸管腫瘍における 5-FU 抵抗性静止状態がん幹細胞が特定される．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

13. 藤沼 駿，中津海 洋一，中山 敬一．(2021, 12/1)
AAV を用いた NAFLD/NASH 治療モデルの開発．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

14. 川村 敦生，片山 雄太，中山 敬一，西山 正章．(2021, 12/2)
クロマチンリモデリング因子 Chd8 の変異による自閉症発症に関与する神経細胞種の同定.（ワークショップ）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

15. 弓本 佳苗，高橋 大輔，中山 敬一．(2021, 12/2)
Keap1 のユビキチン化活性の「減弱」は動物の陸上進出に必要な分子進化である．（ワークショップ）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

16. 杉山 成明，弓本 佳苗，久保田 晋平，高橋 恵生，宮園 浩平，中山 敬一．(2021, 12/2)
原発腫瘍によって誘導される転移抑制的な微小環境の解析．（ポスター発表）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

17. 須賀原 修，小玉 学，中山 敬一．(2021, 12/2)
CRISPR-Cas9 システムを用いたマウス膵がんオルガノイド作製と PPAT 阻害の有効性評価.（ポスター発表）

第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

18. 市原 知哉，松本 有樹修，西田 紘士，今見 考志，石濱 泰，中山 敬一．(2021, 12/3)
精密な翻訳開始点の同定により明らかとなった Non-AUG 翻訳開始の分子機構と生物学的意義．（ワークショップ）
第 44 回日本分子生物学会年会，横浜.

19. Nakayama K.I., Matsumoto M. (2022, 1/19)
Life sciences in the near future: Towards an era of data-driven sciences with artificial intelligence.（シンポジウム）
The 30th Hot Spring Harbor International Symposium: New Technologies Meet Biology, Fukuoka.

器官発生再生学分野

Division of Organogenesis and Regeneration

教　授：鈴木　淳史

Professor：Atsushi Suzuki, Ph.D.

器官発生再生学分野では，哺乳動物の「発生」や「再生」と「疾患」について，幹細胞の性状理解と機能制御を中心に研究を展開している．特に，代謝や解毒の中枢器官である肝臓の発生メカニズムや損傷後の再生メカニズム，幹細胞の機能破綻による疾患の発症メカニズムの解明に向け，遺伝子，細胞，組織，器官，個体レベルの実験を通じて多角的に研究を行っている．そして，得られる知見から「肝臓」という器官を統合的に理解し，肝疾患に対する革新的な治療法の開発へとつなげていく．

2021 年度においては，鈴木淳史（教授），川又理樹（助教），堀澤健一（助教），三浦静（特任助教），河野雄紀（同・博士），後藤那奈子（同・博士），村山僚（同・博士），従野雅義（同・博士），青木美帆（同・博士），井上和也（同・博士），辻野智史（同・博士），唐澤皐月（同・修士），木稲真利慧（同・修士），鈴木陵雅（同・修士），河原真代（医学部生命科学科・4 年生），海江田千晶（テクニカルスタッフ），本田結城（同），太齊真理子（同）の計 18 名で研究を開始した．その後，2021 年 10 月 1 日をもって堀澤健一と三浦静が当研究室の准教授と助教にそれぞれ昇進した．海江田千晶は 2021 年 12 月 31 日に退職し，2022 年 1 月 1 日から川和田知世（事務補佐員）が研究室に加わった．唐澤皐月は 2022 年 3 月に修士号を取得し，2022 年 4 月 1 日より九州大学大学院医学系学府医学専攻（博士）（当研究室所属）に進学することが決定した．河原真代は 2022 年 3 月に九州大学医学部生命科学科を卒業し，2022 年 4 月 1 日より九州大学大学院医学系学府医科学専攻（修士）（当研究室所属）に進学することが決定した．2020 年 3 月に単位修得退学した合谷孟（現九州大学病院・肝臓・膵臓・胆道内科助教）は，2022 年 3 月に博士号（医学）を取得した．後藤那奈子と従野雅義は在学延長し，河野雄紀と村山僚は 2022 年 3 月をもって単位修得退学した．

Ａ．ダイレクトリプログラミングによるマウス肝細胞の直接誘導

肝細胞は多くの転写因子の働きによって胎生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが，まれに，障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある．また，骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し，肝細胞として肝臓組織を構築することもある．これらの事象は，肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を示唆しており，ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる．したがって，もし，このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば，それらを使って皮膚の

線維芽細胞を直接肝細胞へ変化させることが可能になるかもしれない．そこで我々は，肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し，マウスの線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた．その結果，線維芽細胞に Hnf4α と Foxa（Foxa1，Foxa2，Foxa3 のいずれかひとつ）という肝細胞分化に関連した 2 種類の転写因子を導入することで，線維芽細胞を肝細胞の性質を有する「誘導肝細胞（iHepC）」へ変化させることに成功し，肝細胞の運命決定因子を同定した（Sekiya and Suzuki，*Nature*，2011）．作製した iHepC は肝細胞の形態的特徴や遺伝子・タンパク質発現を有し，肝細胞特有の機能をもったまま培養下での増殖や維持，凍結保存が可能であった．また，iHepC は肝細胞と同様に中性脂肪の合成や蓄積と分泌が可能であり，既知の脂肪酸合成阻害薬にも反応することができた（Miura and Suzuki，*Front. Cell Dev. Biol.*，2014）．さらに，肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ iHepC を移植すると，肝細胞として障害を受けた肝臓組織を機能的に再構築し，マウスの致死率を大幅に減少させることが可能であった．本法では，わずか 2 種類の転写因子を線維芽細胞に発現させるだけで，人工多能性幹細胞（iPSC）を経由することなく，直接，線維芽細胞から短時間で肝細胞を作製可能なことから，移植医療や創薬研究，バイオ人工肝臓の開発などへの応用が期待される（Miura and Suzuki，*Inflamm. Regen.*，2014；Suzuki，*Inflamm. Regen.*，2014；Horisawa and Suzuki，*Innovative Medicine: Basic Research and Development*，Springer Japan，2015；Kawamata and Suzuki *J. Biochem.*，2017；Horisawa and Suzuki，*Proc. Jpn. Acad. Ser. B*，2020）．

上述したように，iHepC は医療・創薬への応用が強く期待される細胞だが，その機能レベルが生体の肝細胞よりも低いことが問題であった．そこで次に，iHepC をより高機能な肝細胞へと成熟させるために研究を進めた．その結果，細胞凝集塊形成による Hippo シグナルの活性化，並びに Hnf1α を筆頭とする肝細胞分化関連転写因子の活性化が，iHepC の成熟化を強く促進することを見出した（Yamamoto et al.，*Cell Rep.*，2018）．また，iHepC の発展的研究として，肝細胞へのダイレクトリプログラミング技術をがん治療に応用できないかと考え，これまでの研究で重要性が明らかになった肝細胞分化誘導因子セット（HNF4A，FOXA3，HNF1A）をヒトの肝がん細胞に導入した．その結果，肝がん細胞の長期的な増殖阻害やがん形質の消失，並びに肝細胞分化マーカーの発現上昇が認められた（Takashima et al.，*Cancer Sci.*，2018）．このことから，ダイレクトリプログラミング技術を利用した肝がん細胞の肝細胞化が，肝がんの治療や制御に有効であることが示唆された．

線維芽細胞から iHepC へのダイレクトリプログラミングは，誘導因子の導入後，迅速かつ劇的に進行するが，その分子メカニズムは不明であった．そこで我々は，iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子の挙動を詳しく解析するとともに，線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン

状態変化，エピゲノム状態変化などを統合的に解析し，iHepC の誘導メカニズム解明を試みた．その結果，導入した転写因子の DNA 結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明し，さらに Foxa 転写因子ファミリーの作用機序の違いについて興味深いデータを得ることができた（Horisawa et al., *Mol. Cell*, 2020）．iHepC 誘導因子の 1 つである Foxa3 は，同じファミリーに属する Foxa1 や Foxa2 と同じくパイオニア因子として転写開始点遠位に結合しクロマチン構造を開くが，Foxa3 はその後速やかに転写開始点近位に転位して RNA ポリメラーゼⅡや Hnf4α と結合し，それらと一緒に DNA 上を動くことで標的遺伝子の転写を活性化することが判明した．この特徴的な Foxa3 の作用機序は，Hnf4α と Foxa3 を用いた iHepC 誘導に必須であることも判明した．RNA ポリメラーゼⅡと転写因子の機能的な結合は他の転写因子でも起こりうることから，細胞運命制御に関わる転写因子の新しい機能として，今後の研究の発展が期待される．この研究で明らかとなった iHepC の誘導メカニズムは，iHepC の質の向上や安全性の担保など，iHepC の医療応用において重要な知見になるだけでなく，肝細胞の分化機序やその破綻による病気の発症機構の解明にもつながると考えられる．

B．ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の直接誘導

我々は，マウスの線維芽細胞に 2 種類の転写因子を発現させることで，iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導することに成功した（Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011）．iHepC の誘導技術は，将来，肝疾患治療への応用が期待されることから，マウス iHepC に続き，ヒト iHepC の作製を試みた．しかし，作製されたヒト iHepC は増殖能が低く，大量の細胞を必要とする細胞移植医療や創薬研究に応用することは難しいと考えられた．この問題に対し，我々は，増殖できない肝細胞ではなく，高い増殖能と分化能を有する肝前駆細胞をダイレクトリプログラミングの手法によって作り出せないかと考えた．この考えに基づき転写因子の組み合わせを再検討した結果，最終的に 3 種類の転写因子（FOXA3, HNF1A, HNF6）をヒトの臍帯静脈や末梢血由来の血管内皮細胞に導入することで，長期培養による安定的な増殖が可能な「誘導肝前駆細胞（iHepPC）」を作製することに成功した（Inada et al., *Nat. Commun.*, 2020）．作製されたヒト iHepPC は三次元培養下で肝・胆管組織様構造体を形成し，それぞれ機能的な肝細胞と胆管上皮細胞へ分化・成熟する能力をもっていた．また，ヒト iHepPC から分化した肝細胞を致死率の高い急性肝不全モデルマウス（生存率 2 割）の肝臓へ移植したところ，マウス肝臓内でヒト肝実質組織を再構築して機能し，高い救命効果（生存率 8 割）を発揮することも判明した．ヒト iHepPC から機能的に成熟した肝細胞や胆管上皮細胞を大量に調達できることから，将来，それらを用いた肝疾患患者に対する新しい移植医療の実現や，個人レベルで薬剤の効果や毒性を評価できる医療システムの構築が期待される．

C．ダイレクトリプログラミングによるヒト肝がん形成細胞の直接誘導

予後不良で進行性の肝がんに対する治療法を開発するためには，適切な実験モデルを用いた基礎研究が必要である．近年，ダイレクトリプログラミング技術の進歩によって入手困難な多くの種類の細胞を作製できるようになったことから，ヒト疾患の実験モデルにおける細胞資源としての利用が期待されている．生きた細胞の入手が難しい肝がん研究において，ダイレクトリプログラミングによって肝がん細胞を継続的に供給することができれば，肝がんの治療法開発に向けた実験モデルの確立も夢ではない．そこで本研究では，ゲノム非挿入型エピソーマルベクターを用いたダイレクトリプログラミングによってヒト正常血管内皮細胞から直接，悪性肝腫瘍形成能を有する肝がん細胞を作製できる簡便なワンステップ法の確立を目指して研究を行った．まず，ヒト血管内皮細胞から肝がん形成細胞（liver cancer-forming cell: LCC）へのリプログラミングを誘導可能な因子のスクリーニングを行った．この目的のため，本研究では肝細胞分化や肝細胞のがん化に関わる 9 つの遺伝子とがん抑制遺伝子である *TP53* の発現を抑制するショートヘアピン RNA を選択し，エピソーマルベクターを用いてそれらをヒト血管内皮細胞に発現させる実験系を構築した．この実験系を用いて個々の因子の量を変えたり，除外したりすることで LCC へのリプログラミング誘導因子のスクリーニングを進めつつ，誘導された細胞についてはその増殖能，肝細胞/肝がん細胞関連遺伝子やタンパク質の発現能，形態異常や染色体異常の有無，遺伝子発現プロファイルの変化，生体内における腫瘍形成能などを解析した．その結果，ヒト血管内皮細胞から LCC へのダイレクトリプログラミングを誘導するために必要な因子の組み合わせとして，FOXA3，HNF1A，HNF1B，LIN28B，L-MYC，KLF5 の 6 因子セットを同定した（Goya et al.，*Hepatol. Commun.*，2022）．誘導された細胞（induced LCC: iLCC）は培養下で高い増殖能をもち，肝細胞/肝がん細胞特異的な遺伝子やタンパク質を発現し，その一部には形態異常や染色体異常が観察された．また，iLCC の遺伝子発現プロファイルはヒト肝がん細胞と類似しており，iLCC を免疫不全マウスへ移植すると肝細胞がんと胆管がんの複合型腫瘍を形成した．以上から，今後肝がん患者や健常者から作製される iLCC は，がん研究の発展や肝がんの診断・治療・予後予測法の開発に有用と考えられる．

D．ダイレクトリプログラミングによるマウス及びヒト腸前駆細胞の直接誘導

食物の消化や吸収を担う小腸や大腸は，胎児期の腸管を形成する腸前駆細胞が成体型の腸幹細胞へと成長することによって形成される．これら胎児性の腸前駆細胞や成体型の腸幹細胞は，三次元培養下において生体内の腸上皮組織を模倣した三次元組織構造体（オルガノイド）を形成する．腸上皮オルガノイドは，生体外で腸上皮組織を維持・培養できることから，基礎研究だけでなく，移植医療や創薬研究での利用も期

待されている．しかしながら，材料となる腸組織を生体から生きたまま取り出すことは患者への負担が大きく，また，多能性幹細胞から分化誘導する場合には複雑な方法が必要になるため，腸上皮オルガノイドを医療や創薬に応用するためには，腸上皮オルガノイドの新たな供給源の確保が望まれる．そこで我々は，細胞の運命を人為的に変化させる「ダイレクトリプログラミング」の手法を用いて，胎児性の腸前駆細胞や成体型の腸幹細胞，並びにそれらが作る腸上皮オルガノイドを別の細胞から作製できないかと考えた．上述した iHepC の作製法を基盤として研究を進めた結果，マウスの皮膚やヒトの血管の細胞に 4 つの転写因子（Hnf4α，Foxa3，Gata6，Cdx2）を導入することで，これらの細胞を直接，胎児性の「誘導腸前駆細胞（iFIPC)」へ変化させることに成功した（Miura and Suzuki，*Cell Stem Cell*，2017）．作製した iFIPC は，三次元培養下で腸上皮オルガノイドを形成し，増殖することが可能であった．また，マウス iFIPC が作る腸上皮オルガノイドは，培養条件を変えることで，成体型の「誘導腸幹細胞（iISC)」が作る腸上皮オルガノイドへと成長した．得られた iISC は，腸上皮組織を構成するすべての細胞へ分化する能力（多分化能）と長期間自己と同じ細胞を作り続ける能力（自己複製能）を有していた．また，誘導した iFIPC や iISC が作る腸上皮オルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると，長期間，腸上皮組織を再構築することが可能であった．ダイレクトリプログラミングの手法によって作製される iFIPC や iISC を用いることで，既存の方法に対し，より簡便かつ効率的に腸上皮オルガノイドを取得できることから，今後，作製した腸上皮オルガノイドを用いた腸疾患の病態解析や再生医療，創薬研究への展開が期待される（Miura and Suzuki，*Develop. Growth Differ.*，2018；Miura and Suzuki，*Methods Mol. Biol.*，2020）．

業績目録

原著論文

1. Horisawa-Takada Y., Kodera C., Takemoto K., Sakashita A., Horisawa K., Maeda R., Shimada R., Usuki S., Fujimura S., Tani N., Matsuura K., Akiyama T., Suzuki A., Niwa H., Tachibana M., Ohba T., Katabuchi H., Namekawa S.H., Araki K., Ishiguro K. (2021, Jun)
   Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis.
   Nat Commun. 12:3184.
2. Kozuki S., Sakurai S., Suzuki A., Yamamoto T., Toyoshima F. (2021, Dec)
   Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy.
   Genes Cells. 27:192–201.

3. Goya T., Horisawa K., Udono M., Ohkawa Y., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. (2022, Feb)
Direct conversion of human endothelial cells into liver cancer-forming cells using nonintegrative episomal vectors.
Hepatol Commun. in press.

総説

1. 鈴木 淳史．(2021, 4/15)
肝臓における幹細胞システムの特殊性とリプログラミング．
生体の科学，Vol.72，No.2.
2. 鈴木 淳史．(2022, 1/31)
肝臓と腸におけるダイレクトリプログラミング誘導法の開発．
再生医療，Vol.21，No.1.

受賞

1. 川又 理樹．(2022, 1/28)
新学術領域研究「細胞ダイバース」第4回若手ワークショップ　最優秀発表者賞．

学会発表等

1. 合谷 孟，堀澤 健一，鵜殿 美弥子，小川 佳宏，鈴木 淳史．(2021, 4/9)
ダイレクトリプログラミングによるヒト肝癌モデルの作成．（ポスター発表）
第118回日本内科学会総会・講演会，オンライン．
2. Suzuki A. (2021, 5/21)
Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages. (Invited Speaker)
The 18th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, Japan (Online).
3. 川又 理樹，鈴木 洋，鈴木 淳史．(2021, 6/17)
活性調節型CRISPR-Cas9による安全で効率的な遺伝子治療技術の開発．（招待講演）
日本ゲノム編集学会第6回総会，オンライン．
4. 稲田 浩気，鵜殿 美弥子，松田 花菜江，堀澤 健一，小川 佳宏，田中 靖人，鈴木 淳史．(2021, 9/10)
ダイレクトリプログラミング法によるヒト血管内皮細胞から肝前駆細胞への分化誘導．（一般口演）
第28回肝細胞研究会，兵庫（現地参加）．
5. 鈴木 淳史．(2021, 11/5)
ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の作製．（招待講演）
第62回日本先天代謝異常学会学術集会，オンライン．

6. Inada H., Udono M., Matsuda K., Horisawa K., Ogawa Y., Tanaka Y., Suzuki A. (2021, 11/12)
Generation of cystic fibrosis disease model by using direct reprogramming technology. (Poster)
The 72nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Anaheim, CA, USA (Online).
7. 鈴木 淳史．(2021, 12/2)
文科省・若手官僚もの申す！ ～AirBridgeと考える博士号の価値と活かし方～．（司会）
第44回日本分子生物学会年会キャリアパス委員会ランチョンセミナー，横浜（現地参加）．
8. Masaki Kawamata, Hiroshi I Suzuki, Atsushi Suzuki. (2021, 12/2)
Development of a novel rainbow/barcode dual labeling system using CRISPR-Cas9. (Invited Speaker)
第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「Investigating cellular diversity by multi-scale single cell analyses」，横浜（現地参加）．
9. 堀澤 健一，鈴木 淳史．(2021, 12/3)
肝細胞ダイレクトリプログラミング過程における転写因子のダイナミクス解析．（ポスター発表）
第44回日本分子生物学会年会，横浜（オンライン参加）．
10. Suzuki A. (2021, 12/7)
Direct reprogramming technology for basic research and clinical applications. (Invited Speaker)
Cold Spring Harbor Asia Meeting on Liver Development, Metabolism, Disease & Cancer, Suzhou, China (Online).
11. Kawamata M., Suzuki H.I., Suzuki A. (2022, 1/18)
Development of CRISPR-based rainbow/barcode dual labeling system. (Poster)
The 30th Hot Spring Harbor International Symposium, Chromatin Potential in Development and Differentiation “New Technologies Meet Biology”, Fukuoka, Japan (Online).
12. Suzuki A. (2022, 1/19)
Direct reprogramming technology for basic research and clinical applications. (Invited Speaker)
The 30th Hot Spring Harbor International Symposium, Chromatin Potential in Development and Differentiation “New Technologies Meet Biology”, Fukuoka, Japan (Online).
13. 河野 雄紀，鈴木 淳史．(2022, 3/17)
ダイレクトリプログラミングにより作製したヒト肝前駆細胞による肝線維化の抑制．（一般口演）
第21回日本再生医療学会総会，オンライン．
14. 河原 真代，三浦 静，鈴木 陵雅，鈴木 淳史．(2022, 3/18)
ヒト誘導肝前駆細胞と他細胞の共培養による凝集体形成．（一般口演）
第21回日本再生医療学会総会，オンライン．

15. 鈴木 淳史．(2022, 3/19)
ダイレクトリプログラミング技術を用いた基礎研究の推進と医療展開．（招待講演）
第21回日本再生医療学会総会シンポジウム「多能性幹細胞からの組織構築」，オンライン．
16. 三浦 静，辻野 智史，堀澤 健一，井上 和也，唐澤 皐月，鈴木 淳史．(2022, 3/19)
培養下における肝細胞から腸幹/前駆細胞への運命転換．（一般口演）
第21回日本再生医療学会総会，オンライン．

炎症制御学分野

Division of Inflammation and Proteostasis

教　授：池田　史代

Professor：Fumiyo Ikeda, Ph.D., D.D.S.

当分野では，炎症の制御機構を解明することを目的としている．そのために，翻訳後修飾の一つであるユビキチン化や，細胞内分解システムの一つであるオートファジーに着目し，生化学的手法から遺伝子改変マウスまでを含めた，多岐にわたるアプローチを使って解析を進めている．

当分野には，令和３年４月に，医学部生命科学科４年生の清田が新たに参加した．

本年度，池田は新たに競争的外部資金として基盤研究（A），新学術領域研究（研究領域提案型），武田報彰医学研究助成を獲得し，一昨年度から継続する池田の科研費（帰国発展支援）および柳谷の科研費（基盤研究（C））と合わせた資金により，研究を進行した．

令和３年度の主な研究成果を以下に述べる．

Ａ．直鎖型ユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC の構成因子である HOIL-1L 分子による炎症制御機構の解明

本プロジェクトは，直鎖型ユビキチン鎖を制御する唯一のユビキチンリガーゼ複合体として知られる LUBAC の構成因子の制御メカニズムに関する研究である．LUBAC の構成因子である HOIL-1L や HOIP についてはヒト自己免疫疾患患者における遺伝子変異も見つかっており，これらの炎症や免疫反応の制御機構を明らかにすることは重要である．当分野では，これまでに生化学的手法，細胞学的手法，遺伝子改変マウスなどを用いて，LUBAC の炎症反応制御の機構を明らかにしてきた．本年度は，LUBAC 構成因子のうち，ユビキチンリガーゼ分子としての予測はされてきたにも関わらず，その機能や制御機構がよくわかっていなかった HOIL-1L に着眼した，以下のプロジェクトの成果を発表した．

HOIL-1L にはリガーゼ部位 RBR が存在するが，直鎖型ユビキチン鎖生成において酵素活性中心を持たない．よって，HOIL-1L は偽リガーゼだと信じられてきたが，最近 Kelsall et al.により，HOIL-1L がリガーゼ活性依存的に新規エステル結合型のユビキチン化を担うことが明らかにされた．さらに，我々は HOIL-1L 依存性のエステル結合によるユビキチン化が，すでに形成されたユビキチンの鎖を追加して修飾することを明らかにした．また，ネガティブ染色電子顕微鏡技術（Negative Stain Electron Microscopy），Crosslinking 質量分析法，および Mass photometry 法により，これまで不明であった LUBAC のストイキオメトリについて解析を行った．これらについては，

博士課程の学生 Carvajal が中心となってプロジェクトを進行し，この研究成果は eLife に発表した(Rodriguez Carvajal A et al.,eLife. 10:e60660)．なお，HOIL-1L のリガーゼ活性の生体内における役割は不明であることから，現在，HOIL-1L リガーゼ不活型変異体を発現するノックインマウスを CRISPR-Cas9 技術により新規に作製し（樹立済），初代培養系，およびマウスにおける生理学的機能の解析を奥村が中心となり進めている．

また,HOIL-1L には直鎖型のユビキチン鎖を特異的に認識する NZF 部位が存在する．この部位は，炎症反応細胞内シグナルに重要であることが知られているが，その詳しい生物学的効果や制御機構については不明である．よって，我々は HOIL-1L-NZF の直鎖型ユビキチン鎖と結合できない変異体を発現するノックインマウスを CRISPR-Cas9 技術により作成し，その生体内における役割を解析した．その結果，マウスにおける HOIL-1L-NZF の変異の挿入により，LPS やサイトカイン TNF 誘導性ショック反応が明確に抑制されることを観察した．メカニズムとしては，HOIL-1L-NZF の変異体は TNF 受容体にうまくリクルートされないことが原因となり下流シグナルである NF-kB 活性が抑制されると考えられる．この研究は博士課程学生である Gomez-Diaz が中心となって進め,成果を iScience に発表した(Gomez-Diaz C et al., iScience. 24(11):103241)．

これらの研究成果については，池田が第 29 回日本 Cell Death 学会学術集会，9th PROTEASOME and AUTOPHAGY CONGRESS，第 33 回日本神経免疫学会学術集会，第 94 回日本生化学会，第 44 回 日本分子生物学会年会，Pacifichem 2021 において，それぞれ口演（招待講演）した．

B．抗 HOIL-1L ナノボディーを用いた LUBAC 活性制御機構の解明

HOIL-1L による新規ユビキチンコード(エステル化による直鎖型ユビキチン鎖修飾)の誘導機構を含め，LUBAC の制御機構や細胞内動態，インタラクトームを解析するための分子ツールの開発を清田が中心となって進めている．分子ツールの基盤としては，小分子で安定性と特異性の高いナノボディーを用いることとした．まず，当研究室独自に開発した抗 HOIL-1L ナノボディークローンのうち，ELISA により結合を確認したものについて，バクテリアを用いたタンパク発現システムにより大量精製した．これらが LUBAC の酵素活性に与える影響を評価するために，生化学的に直鎖ユビキチン鎖誘導を検証したところ，1 つのナノボディークローンの添加によって抑制効果が確認された．これは，HOL-1L の活性を制御する世界初の分子ツールであることから，本研究成果は抗 HOIL-1L ナノボディーを用いて自己免疫疾患や神経変性疾患への関与が示唆されている LUBAC の活性制御の分子機構を解明し，将来的にはこれらの疾患に対する治療薬開発に貢献できると期待される．

C．抗アポトーシス分子 XIAP のオートファジー制御における役割とその制御機構の解明

ユビキチンリガーゼであり，抗アポトーシス分子である XIAP は，クローン病などの自己免疫疾患において遺伝子変異が見つかっており，ヒトにおける免疫，炎症制御に役割を果たすことが示唆されている．われわれは，過去に行ったオートファジー誘導因子を同定するためのスクリーニングによって，XIAP を同定したこと，またその既知の機能が，炎症や細胞死といったわれわれの研究の着眼点と重なったことから，XIAP がどのようにオートファジーを制御しているのか，その分子学的制御機構を明らかにすることを目的として研究を進めている．生化学的解析により確認した酵素活性抑制型の XIAP 変異体を発現するノックインマウスについては CRISPR-Cas9 技術により作製済みであり，これらのマウス由来の細胞やマウスにおけるゼノファジー（細菌感染に対するオートファジー）について，根津が中心となり解析を進行中である．

D．オルガネラ量の恒常性を司るシステムの理解

細胞内のオルガネラの存在量は，その生合成と分解によって制御されている．オルガネラがダメージを受けると，オートファジーによって分解されることが知られている．一方で，オルガネラの基礎量は動物種に関わらず，細胞種によって決まっている．これは，細胞種によって決まったオルガネラ量を恒常的に保存する機構，オルガネラ量恒常性維持機構が備わっていることを示唆しているが，その全貌は理解されていない．我々は，オートファジーによって，狙ったオルガネラを減少できる細胞株を樹立して，任意のオルガネラを減少させた場合に引き起こされる細胞応答を解析している．そのなかで，ミトコンドリアを減少させた場合に，活性化する細胞応答を見出している．この細胞応答は，ミトコンドリア量が回復する細胞において，ミトコンドリアゲノムの遺伝子発現を制御する可能性を示唆するデータが得られており，その生物的意義の解明を目指している．本研究成果をもとにした申請で，柳谷は 2022 年からの創発的研究支援事業(JST)の助成対象者として採択された．

業績目録

原著論文

1. Gomez-Diaz C., Jonsson G., Schodl K., Deszcz L., Bestehorn A., Eislmayr K., Almagro J., Kavirayani A., Seida M., Fennell L.M., Hagelkruys A., Kovarik P., Penninger J.M., Ikeda F. (2021, Oct)
   The ubiquitin ligase HOIL-1L regulates immune responses by interacting with linear ubiquitin

chains.
iScience. 24(11):103241.

2. Rodriguez Carvajal A., Grishkovskaya I., Gomez Diaz C., Vogel A., Sonn-Segev A., Kushwah M.S., Schodl K., Deszcz L., Orban-Nemeth Z., Sakamoto S., Mechtler K., Kukura P., Clausen T., Haselbach D., Ikeda F. (2021, Jun)
The linear ubiquitin chain assembly complex LUBAC generates heterotypic ubiquitin chains.
eLife.10:e60660.

総説

1. 柳谷 耕太. (2021 年 4 月)
みなしごタンパク質の品質管理機構.
生化学. 93(2):239-242.
2. 池田 史代. (2021 年 11 月)
ユビキチン分子によるコーディングシステム.
生化学. 93(6):1-9.
3. Tokunaga F., Ikeda F. (in press.)
Linear ubiquitination in immune and neurodegenerative diseases, and beyond.
Biochemical Society Transactions.

学会発表

1. 池田 史代. (2021, 7/26)
新規ユビキチンコードとその生理学的役割. (口頭発表)
第 29 回日本 Cell Death 学会学術集会, オンライン開催.
2. Fumiyo Ikeda. (2021, 10/15)
Linear ubiquitin chains and its variants generated by Linear Ubiquitin chain Assembly Complex (LUBAC) in the inflammatory responses. (口頭発表)
9th PROTEASOME and AUTOPHAGY CONGRESS, Clermont-Ferrand, France, Clermont-Ferrand, France, オンライン開催.
3. 池田 史代. (2021, 10/22)
新規ユビキチンコードを誘導するユビキチンリガーゼによる炎症制御機構. (口頭発表)
第 33 回日本神経免疫学会学術集会, 福岡, オンライン開催.
4. 池田 史代. (2021, 11/4)
RBR 型ユビキチンリガーゼ HOIL-1L による炎症反応制御. (口頭発表)
第 94 回日本生化学会, オンライン開催.
5. Carlos Gomez Diaz, Alan Rodriguez, Mayu Seida, Akiko Okumura, Fumiyo Ikeda. (2021, 12/1-3)

Regulation of inflammation and ubiquitin esterification by the RBR ubiquitin ligase HOIL-1L（RBR 型ユビキチンリガーゼ HOIL-1L によるユビキチンエステル化と炎症反応制御）. (口頭発表)
第 44 回 日本分子生物学会年会，横浜.

6. Fumiyo Ikeda. (2021, 12/16-21)
Linear ubiquitin chains and its variants generated by Linear Ubiquitin chain Assembly Complex (LUBAC). (口頭発表)
Pacifichem 2021，オンライン開催.

7. 池田 史代. (2022, 3/28)
ユビキチンによる炎症反応シグナルの制御. (口頭発表)
令和 3 年度　全国共同研究拠点シンポジウム，オンライン開催.